

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: B200426006

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

弓形虫速殖子的培养、
实时 PCR 检测药物对其 DNA 复制的影响
及其质体基因克隆表达研究

Studies on the cultivation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,
the effects of drugs on its DNA replication detected by Real
time PCR, the clone and expression of its plastid genes

赵 卿

指导教师姓名: 林宇光教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2007 年 7 月 04 日

论文答辩时间: 2007 年 7 月 16 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 苏新专研究员

评 阅 人: _____

2007 年 6 月 20 日

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。

厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在年解密后适用本授权书。

2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
缩写语对照表.....	5
第一部分 RH 株弓形虫培养、保藏及病理切片观察.....	6
引言.....	6
第一节 材料与方法.....	12
第二节 结果.....	16
第三节 讨论.....	39
参考文献.....	40
第二部分 Real time定量PCR检测六种药物对弓形虫质体及 核DNA复制的影响.....	42
引言.....	42
第一节 材料与方法.....	46
第二节 结果.....	60
第三节 讨论.....	65
参考文献.....	72
第三部分 RH 株弓形虫质体基因 <i>ycf24</i> 和 <i>c/pC</i> 的克隆及表达	72
引言.....	77
第一节 材料与方法.....	87
第二节 结果.....	97
第三节 讨论.....	99
参考文献.....	101
综述.....	114
附录.....	115
致谢.....	124

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT (IN CHINESE)	1
ABSTRACT (IN ENGLISH)	3
ABBREVIATION.....	5
PART I <i>Toxoplasma gondii</i> RH Culture, Storage and Observation.....	6
Introduction.....	6
Section I Materials and Methods.....	12
Section II Results.....	39
Section III Discussion.....	40
References.....	42
PART II Effect of six drugs on the replication of DNA of <i>Toxoplasma gondii</i> in vitro detected by the method of real-time PCR.....	42
Introduction.....	42
Section I Materials and Methods.....	46
Section II Results.....	60
Section III Discussion.....	65
References.....	68
PART III Clone and Expression <i>ycf24</i> and <i>clpC</i> gene of <i>Toxoplasma gondii</i> ...	72
Introduction.....	72
Section I Materials and Methods.....	77
Section II Results.....	87
Section III Discussion.....	97
References.....	99
REVIEW.....	101
APPENDIX.....	115
ACKNOWLEDGMENT.....	124

弓形虫速殖子的培养、 实时 PCR 检测药物对其 DNA 复制的影响 及其质体基因克隆表达研究

中 文 摘 要

本论文分三部分：

第一部分 体内及体外传代培养弓形虫速殖子，了解弓形虫的形态特点及对感染小鼠脏器损伤，并制备小鼠抗弓形虫抗体，用免疫组织化学方法检测感染小鼠组织内的弓形虫速殖子。

第二部分 质体属于痕迹器官，有植物细胞或原核细胞的特征，与植物叶绿体有同源性。该质体 DNA 是除线粒体外的另一个核外基因组，可作为抗生素作用靶标。为检测药物对弓形虫 DNA 复制的影响，选用六种药物（环丙沙星、乙酰螺旋霉素、克林霉素、阿齐霉素、蒿甲醚、磺胺嘧啶）处理 HeLa 细胞培养的弓形虫速殖子，处理 48h、72h 后，用 TaqMan Real time 定量 PCR 检测质体基因组（Genbank No. U87145）中的 *ycf24* 基因和核基因 *UPRT*（Genbank No. U10246）的拷贝数，用 Spss14.0 软件分析了六种药物处理后两个检测基因的拷贝数及比值，以衡量六种药物对弓形虫 DNA 复制的影响。结果表明，药物处理 48h 后，环丙沙星处理组对质体作用最明显，单位虫体质体数目为对照组的 22%，其次为克林霉素（29%）、乙酰螺旋霉素（39%）、阿齐霉素（63%）、蒿甲醚和磺胺嘧啶（73%、80%）；蒿甲醚减虫效果最明显（29%），其它药物减虫作用不明显；处理 72h 后，蒿甲醚减虫作用最明显（31%），其它药物不明显；而环丙沙星、克林霉素、阿齐霉素均使质体降低，与对照组差异显著，但三者之间差异不显著，乙酰螺旋霉素对质体影响低于环丙沙星、克林霉素和阿齐霉素，磺胺嘧啶对质体影响最小。

本部分内容表明检测弓形虫质体 DNA 的 Real time PCR 方法是可行的，首次建立了以质体 DNA 为目的基因检测弓形虫感染的 Real time PCR 方法；由于

弓形虫质体具有显著区别于宿主的特征，可以增加检测的准确性，同时，可用于筛选针对质体 DNA 的抗弓形虫药物，对当前抗弓形虫药物药效重新评价，可用该方法筛选可能的抗弓形虫药物，为新的抗弓形虫药物的筛选及开发提供一定参考作用。

第三部分 目前尚无克隆表达弓形虫质体 $ycf24$ 及 $clpC$ 基因的报道，研究这两种基因是否转录及表达，对弓形虫质体相关研究将具有重要意义，本部分初次尝试克隆表达这两个基因。利用DNASTAR软件包预测 $ycf24$ 及 $clpC$ 表达产物的二级结构及抗原表位。克隆弓形虫质体基因 $ycf24$ 和 $clpC$ ，成功构建了表达载体pMXB10—Ycf I、pMXB10—Ycf II及pMXB10—ClpC I，并对*E.coli* ER2566/pMXB10—Ycf I、*E.coli* ER2566/pMXB10—Ycf II进行了诱导，通过SDS—PAGE及Western blot证明pMXB10—Ycf I在*E. coli* ER2566中有表达，至于 $ycf24$ 、 $clpC$ 基因在弓形虫是否转录并表达尚需进一步实验验证。

关键词：弓形虫；质体基因；Real time PCR； $ycf24$ ； $clpC$

**Studies on the cultivation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,
the effects of drugs on its DNA replication detected by Real
time PCR, the clone and expression of its plastid genes**

ABSTRACT

This dissertation includes three parts.

Firstly, *Toxoplasma gondii* RH was passed by the method of celiac inoculation in mice and in Hela cells in vitro. The shapes of tachyzoites cultured in vivo and in vitro were separately observed under microscopy. And the damage to the tissues of mice infected by *T.gondii* was observed through HE dyeing. At the same time anti-toxoplasma antibodies were prepared for immunohistological detection.

In the second part, although *Toxoplasma gondii* is one kind of unicellular protozoa with eunuclear, its plastid-like organelle or Apicoplast, the remnant of an algal plastid, is another extrachromosomal genome except for the mitochondrial DNA. Plastid might be potential target sites for antibiotics. To detect the effects of agents on the replication of *T.gondii* DNA, six drugs (ciprofloxacin, acetylspiramycin, clindamycin, azithromycin, artemether, sulfadiazine) were used to treat the *T. gondii* cultured in Hela cells. After drug treatment for 48h and 72h, the copies of *ycf24* gene of apicoplast genome (Genbank No. U87145) and genomic *UPRT* locus (Genbank No. U10246) were respectively detected by TaqMan Real time quantitative PCR to evaluate the effects of six drugs on DNA replication of *T.gondii*. The copies and ratios of these two genes were analyzed by statistics software Spss14.0. The result showed, after drug treatment for about 48h, ciprofloxacin was the most effective to plastid for the plastid number of each tachyzoite was about 22% of the control. The extent of these compounds inhibited plastid proliferation was as followings: clindamycin> acetylspiramycin> azithromycin> artemether>sulfadiazine, which was respectively about 29%, 39%, 63%, 3%, 80% of the control. Artrmether suppressed the

proliferation of tachyzoites most significantly, while nor did other drugs. After drug treatment for 72h, artemether was also the most effective to suppress the proliferation of tachyzoites and nor was others. Ciprofloxacin, clindamycin and azithromycin could reduce the number of plastid in each tachyzoite compared with control, while each other of them had no significantly differences. The effect of acetylspiramycin on plastid number of each tachyzoite was less than ciprofloxacin, clindamycin and azithromycin. Sulfadiazine was the most incompetency to this effect.

In this part, it showed that the method of Real time PCR based on plastid DNA of *Toxoplasma gondii* is feasible and it was the first time this method was used in detecting infection of *T. gondii*. Because the character of plastid in *T. gondii* distinguishes its host, this method can be more exactly in detection. What's more, this method can be used in screening and evaluating drugs targeting plastid DNA, which maybe provide referenced clues in new drugs development.

In the last part, although presently there is no report about the clone and expression of the plastid genes, *ycf24* and *clpC*, it may be important and valuable for realization of plastid of *Toxoplasma gondii*. Here it was the first time to clone and express these two genes. The expression products of *ycf24* and *clpC* genes were respectively analyzed by the software of DNASTAR to predict their secondary constructure and antigenic epitopes. In the last part, *ycf24* and *clpC* gene in plastid of *Toxoplasma gondii* were respectively cloned into vector pMXB10 and then corresponding recombination *E. coli* ER2566/pMXB10-Ycf I and *E. coli* ER2566/pMXB10-Ycf II were respectively induced by IPTG in *E. coli* ER2566. The result showed, pMXB10-Ycf I were expressed in this bacteria slightly where no pMXB10-Ycf II were expressed. Many works should be done again to prove if *ycf24* and *clpC* genes are expressed in *Toxoplasma gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Plastid gene; Real time PCR; *ycf24*; *clpC*

缩写语对照表

Amp	氨苄青霉素
DAB	二氨基联苯二胺
<i>E. coli.</i>	大肠杆菌
FAM	6-羧基荧光素
FBS	胎牛血清
HRP	辣根过氧化物酶
g, mg, μ g, ng	克、毫克、微克、纳克
h, min, sec, d	小时、分钟、秒、天
Real-time quantitative PCR	实时定量 PCR
rpm	转/分
RT	室温
L, ml, μ l	升、毫升、微升
PBS	磷酸盐缓冲液
SDS	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TAMRA	6-羧基四甲基罗丹明
Tris	三羟甲基氨基甲烷
<i>UPRT</i>	尿嘧啶磷酸转移酶基因
UPRT	尿嘧啶磷酸转移酶
Western blot	免疫印迹
<i>ycf24</i>	<i>ycf24</i> 基因
Ycf24	<i>ycf24</i> 基因表达蛋白
<i>c1pC</i>	<i>c1pC</i> 基因
ClpC	<i>c1pC</i> 基因表达蛋白

第一部分 RH 株弓形虫培养、保藏及病理切片观察

引言 关于弓形虫研究

1. 弓形虫分类地位

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 属于动物界 (Animalia)、原生动物门 (Protozoa)、顶复亚门 (Apicomplexa)。该亚门包括 300 个属 4000 多个种的细胞内原虫, 许多是人兽共患寄生虫^[1]。顶复亚门细胞内寄生虫共同特征是: 细胞结构极化分布, 细胞骨架复杂, 顶端的器官排列复杂^[2]。疟原虫 (*Plasmodium*)、弓形虫 (*Toxoplasma*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 造成世界性人群感染, 导致发病和/或死亡; 艾美耳球虫 (*Eimeria*)、巴贝西虫 (*Babesia*)、泰勒虫 (*Theileria*) 等则感染鸡、牛、猪、鱼、羊, 导致严重发病和死亡。

2. 弓形虫的发现及命名

1908 年, Nicolle 和 Manceaux 从北非鼠 (*Ctenodactylus gondi*) 体内分离得到弓形虫, 同时 Splendore 在巴西也发现弓形虫^[3]。根据其来源命名其种名, 其属名来自希腊字 *toxos*, 意为弓, 指该生物体呈新月型^[3]。在我国, 于恩庶先生于 1957 年在猫体内最早发现弓形虫^[3]。

3. 弓形虫生活史

弓形虫感染的动物细胞具有多样性, 所有哺乳动物的有核细胞, 甚至昆虫和鱼类等细胞都可感染^[4-5]。

弓形虫生活史包括无性繁殖和有性繁殖两个周期, 有性繁殖只能在猫科动物肠道内完成, 无性繁殖可在所有哺乳动物有核细胞、鸟类甚至昆虫和鱼类细胞内完成^[6], 猫也是弓形虫的中间宿主。根据感染的急性和慢性程度, 无性繁殖分为两个时期, 即分裂快速的速殖子期和分裂缓慢的缓殖子期。急性感染的速殖子约 5 μ m 长, 2 μ m 宽, 在离体培养的细胞内繁殖一代约需 6~8h, 从细胞释出感染邻近的细胞, 通常每个细胞内可积累 64~128 个速殖子^[2], 也有积累到 250 多个速殖子后裂解的报导^[4], 所积累速殖子的数目与宿主细胞大小有关。

在感染动物体内, 速殖子经 7~10d 后可分化为缓殖子, 形成包囊。包囊主要分布于中枢神经系统和肌肉组织, 并能在宿主体内终生存在^[2]。遍布全身的包囊

发育为无性周期的慢性期。若误食感染组织，摄入的包囊在通过消化道时破裂，可导致缓殖子释放，这些缓殖子感染消化道上皮，重新分化为速殖子而遍布全身，完成无性周期。通常免疫效应可有效阻止速殖子扩散，缓殖子重新分化为速殖子的速率低。然而在免疫功能低下或免疫缺陷的情况下，免疫系统可能监测不到这些转化或免疫发生快，在此情况下，便有可能使弓形虫病患者延误治疗而病情严重，甚至致命。

4. 弓形虫超微结构^[4]

(1) 大量的调节分泌器官

与其机会性胞内寄生生活方式相适应，弓形虫有许多分泌器官。其分泌器官包括顶端微丝体（micronemes）和棒状体（rhoptries）及大量的局部分布的致密颗粒（dense granules）。

分泌器官的分泌活动有时间差异。在吸附—侵入过程的早期，微丝体释放其内容物；在侵入过程中，棒状体释放其内容物；在侵入基本完成时，致密颗粒释放其内容物。

(2) 细胞骨架

弓形虫细胞骨架包括复杂的微管和其他大分子结构，这些结构指导极性分泌，使弓形虫能跨细胞表面滑行和侵入宿主细胞。在细胞前端，呈锥形环包裹的管状结构，称为锥状体。锥状体由14个未知的组分组成，这14个组分从后部的棒状体开始，逆时针螺旋，两个400nm长的微管从锥状体的锥形环延伸，通过锥状体中心，终止于细胞内。这些管紧密结合，包被于致密基质中，致密基质与顶端的棒状体和微丝体紧密联系在一起。据推测，微管的功能是作为这些器官的骨架，使这些器官穿过锥状体从顶端分泌内容物。

5. 弓形虫粘附、侵入及胞内繁殖、释出^[6-8]

胞内寄生虫首先要与宿主细胞发生紧密接触，才有可能进入细胞，而宿主细胞表面和寄生虫表面都带负电荷，存在斥力，所以寄生虫通过受体—配体相互作用方式进入宿主细胞，实现紧密粘连、移动进而侵入。弓形虫的宿主细胞具有多样性，表明弓形虫表面可能存在不同受体与相应细胞表面配体作用。

在弓形虫表面参与粘连的多种蛋白通过糖基磷脂酰肌醇（Glycosylphosphatidylinositol, GPI）与细胞膜相联系。通过鉴定这些蛋白的基因

发现, 弓形虫表面主要由表面抗原SAG1相关的一个蛋白家族组成。SAG1是其中含量最丰富的, 参与和宿主细胞粘连的过程。但是*sag1*突变的弓形虫仍可与宿主细胞发生粘连, 虽然粘连比未突变时差, 但进入宿主细胞平均所需时间反而减短, 表明粘连过程还有其它蛋白参与。新糖蛋白牛血清白蛋白葡糖胺(neoglycoprotein bovine serum albumin glucosamide)作为竞争抑制子, 可以部分阻断SAG1和宿主细胞的相互作用。

弓形虫运动是感染侵入所必须的条件。在宿主细胞表面的运动方式是跨膜滑行, 该过程需要能量, 运动速度从1~10 μ m/s, 但其作用机制尚不明了。由于弓形虫呈新月型, 细胞骨架呈螺旋型, 其滑行方式呈现锥形跨膜运动, 最终呈现出沿着细胞纵轴螺旋型的弹道形式。

首先是跨细胞的滑行运动, 然后进入宿主细胞。进入吞噬细胞如巨噬细胞需要2~4min, 相对较慢, 不呈现极极性, 任何方向均可进入。吞噬弓形虫过程, 吞噬细胞的细胞膜起皱, 把寄生虫捕获在一个不严密的吞噬泡内, 吞噬泡在2~4min内形成。吞噬作用一般有明显的细胞重排过程, 涉及宿主细胞骨架重排及宿主蛋白酪氨酸磷酸化^[8]。吞噬体会迅速酸化, 随后进入细胞内水解过程。

进入非吞噬细胞过程非常迅速, 在15~30sec内完成, 呈现极极性, 首先是顶端进入。弓形虫侵入宿主细胞不会诱导宿主细胞膜起皱、肌动蛋白微丝重排, 或者宿主蛋白酪氨酸磷酸化。弓形虫进入非吞噬的宿主细胞没有细胞重排, 是一个主动过程, 胞内的肌动蛋白/肌球蛋白(actin/myosin)及与它们相连的跨膜蛋白参与该过程。侵入迅速, 在25~40sec内, 虫子进入宿主细胞, 形成严密的纳虫泡。在侵入过程, 顶端器官分泌活动是极性的, 首先在粘连—侵入过程, 微丝体分泌; 在侵入过程, 棒状体分泌, 最后在侵入基本完成后, 致密颗粒分泌其内容物。

胞内寄生虫侵入宿主细胞后, 必须防止细胞对其水解。弓形虫侵入, 会形成纳虫泡。纳虫泡与吞噬体不同之处在于: 迅速排除或终止离子泵及膜泡融合形成的蛋白, 因而不会酸化, 不与细胞内其它小泡融合。同时纳虫泡还具有如下功能, 弓形虫是嘌呤营养缺陷型, 但不直接利用ATP, 而是将ATP水解后利用, 纳虫泡膜上有孔, 内有NTPase, 可以水解ATP为腺苷后加以利用。在侵入宿主后, 纳虫泡膜立即征募宿主细胞的线粒体和内质网, 为纳虫泡提供脂类, 表明

弓形虫可能不能进行新脂类的合成。另外关于纳虫泡的成分中缺少宿主细胞蛋白的原因尚不明了。

弓形虫速殖子在细胞内分裂繁殖是内生分裂方式，在细胞内增殖S期 $\leq 2h$ ，G₂/M $< 1h$ ，G₁ $\approx 4h$ ，整个细胞周期 $> 7h$ 。

弓形虫从宿主细胞内裂解释放出来的过程迅速，依次穿过纳虫泡膜、宿主细胞质、宿主细胞膜，使细胞裂解，释放出的弓形虫速殖子可以运动，迅速侵入邻近的细胞并形成新的纳虫泡，完成一个裂解周期。

6. 弓形虫病发病机理及治疗

在人类，临床弓形虫病通常局限于免疫力衰退者或孕妇急性感染造成的先天性弓形虫病。先天性弓形虫感染疾病严重程度与孕妇发生急性感染的时期有关^[9-10]，在怀孕前感染导致隐性不育；怀孕早期感染导致死胎、流产、死产或畸形儿等不良结果；怀孕中期感染会出现死胎、早产和严重的脑、眼疾患；怀孕后期感染大多为隐性感染，但胎儿在出生后可表现出以侵害中枢神经和双眼为主的多种发育异常，如脑积水、无脑儿、小头、小眼或无眼，或逐渐出现不同程度的智力损害及精神发育异常等表现。

全世界弓形虫感染率不等，在北美感染率为15~20%^[11]；65%法国妇女患有弓形虫病^[12]，中国感染率为5~20%^[3]。免疫衰退者的增多，导致严重弓形虫病的增加，如60~90%AIDS患者会感染弓形虫^[11]。在免疫衰退的患者中，弓形虫经常使大脑病灶性损伤而导致弓形虫脑炎。若不进行治疗，弓形虫脑炎可致死。

当前药物治疗（磺胺嘧啶等）能够有效杀死速殖子期，但不能治疗慢性缓殖子期，因而需要长期治疗。这些药物的副反应，及不能有效清除感染，在评价药物治疗效果时应注意药物安全性和有效性评价。

7. 弓形虫感染检测方法

传统弓形虫检测方法包括病原学检测（直接进行涂片或组织切片检测到弓形虫虫体，进行小鼠接种或组织培养检测）；影像学检测（X光，CT，超声波检测）；血清学免疫技术检测（包括血清中的循环抗原检测和血清抗体检测），常用ELISA，凝集检测及其它免疫吸附方法如Western blot或Sabin-Feldman染色。Sabin-Feldman染色是最经典的公认检测方法，但该方法需要活的弓形虫速殖子，一般实验室或检测室难以做到^[7]。

同时以上检测方法存在许多问题，弓形虫病具有临床症状非典型性和寄生部位的广泛性，加之病原学检查因体液标本中虫数往往不多，涂片直接镜检和动物接种的检出率极低，形态难鉴别，病原分离需要条件和技术，又费时费力，常造成漏诊和误诊^[6]。

血清免疫技术是当前弓形虫感染和疾病诊断的主要手段，但有许多局限性，包括诊断困难，耗时，需要专业技术人员，另一方面是在免疫抑制人群或AIDS患者中，由于缺乏正常功能的免疫效应，血清学检测方法较差，抗体检测仅适用于母婴传播危险评价或是否免疫抑制患者复发的确定，对免疫缺陷患者或免疫抑制人群，适宜进行PCR检测^[8-9]。

PCR法优点^[15]：简便、灵敏、特异性；测定血样与水样具有同样结果，避免了眼睛穿刺；PCR方法比传统方法在诊断弓形虫病中具有优点，尤其是对于血清学检测失败和临床症状不明显的弓形虫病诊断中的优点更明显。

8. 弓形虫研究的重要意义^[13]

弓形虫具有如下特征，可用于遗传分析，逐渐成为研究胞内寄生虫的模式生物。

(1) 由于可感染任何哺乳动物有核细胞，故易于体外标准细胞培养条件下增殖。

(2) 经典遗传杂交可以在猫体内进行，可用于研究参与特定表型的等位基因作图及数量确定。

通过两个不同株系间的杂交，一个弓形虫的基因组遗传图谱已经产生，该图谱用64个限制性片段长度多态标记，把药物抗性座位与已知的11条染色体上特异区域联系在一起。

(3) 弓形虫核基因组大小为 8×10^7 bp，是单倍体，易于通过化学突变改变甚至终止基因的表达。

(4) 由于速殖子的有效迁移能力，可以通过噬斑纯化得到无性繁殖克隆系。

(5) 弓形虫是真核单细胞生物，感染的宿主细胞呈多样化，可作为研究真核生物模式，从事感染致病及真核生物功能研究。如以 RH 株弓形虫研究细胞凋亡信号途径。

9. 本部分研究的目的

通过在体内及体外传代培养弓形虫速殖子，了解弓形虫速殖子形态特点及保种方法，为后期实验奠定基础。同时制备小鼠抗弓形虫全虫多克隆抗体，用于免疫组织化学检测及后期 Western blot 检测。

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库